

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2005-034121

(43)Date of publication of application : 10.02.2005

---

(51)Int.Cl. C12Q 1/68  
G01N 33/02  
G01N 33/53  
G01N 33/566  
G01N 33/569  
// C12N 15/09

---

(21)Application number : 2003-296882

(71)Applicant : NAGASAKI PREFECTURE

(22)Date of filing : 15.07.2003

(72)Inventor : TAGURI TOSHITSUGU  
NOGUCHI EITARO  
HIRAYAMA FUMITOSHI

---

(54) EN BLOC DETECTION METHOD FOR BACTERIUM CAUSING FOOD POISONING AND REAGENT THEREFOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a simple, rapid and inexpensive en bloc detection method for plurality of pathogenic bacteria that can save the time and the labor needed for a primer designing and the evidence for characteristics and utilizes a multiplex PCR (polymerase chain reaction) technique that is effective for quality control.

SOLUTION: The method comprises two steps, namely the one step where an effective primer couple group that is amplifiable under a prescribed temperature condition is selected from a plurality of readily known primers for PCR and its concentration is adjusted and another step where a specific reagent is prepared.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-34121

(P2005-34121A)

(43) 公開日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/02	G O 1 N 33/02	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/569 B	
審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-296882 (P2003-296882)

(22) 出願日 平成15年7月15日 (2003. 7. 15)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 000214191

長崎県

長崎県長崎市江戸町2番13号

(72) 発明者 田栗 利紹

長崎県長崎市滑石1丁目9番5号長崎県衛生公害研究所内

(72) 発明者 野口 英太郎

長崎県諫早市室崎町7番2号

(72) 発明者 平山 文俊

長崎県諫早市永昌町2番22号

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA05 HA11 HA19

4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ16 QQ42

QR38 QR62 QR75 QS16 QS25

(54) 【発明の名称】 食中毒起因細菌の一括検出方法及びその試薬

## (57) 【要約】

【課題】複数種類の病原細菌を対象として、プライマー設計および特異性証明に必要な時間、労力および経費を節減すると共に精度管理に有効なマルチプレックスPCR法を利用した簡便、迅速かつ安価な一括検出方法及び試薬を提供する。

【解決手段】多数の既成PCR用プライマー対から、一定温度条件下で増幅可能な有効プライマー対群を選抜し濃度調整をする工程と、具体的な試薬作製の工程を備える。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

菌種特異性または菌属特異性が証明されたプライマー対群を検査用途にしたがって選抜した後グループ化し、それぞれのプライマー対の競合作用を調べ、競合しないプライマー対群はそのままの条件を用い、競合するプライマー対群には濃度比を変えた反応液列を用いて最適濃度比を決定することで、グループ化後のプライマー対群の最適濃度条件を決定することを特徴とする食中毒起因細菌の一括検出方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 で選抜、調整したグループ化後プライマー対群溶液を、無菌および DNAase フリーのディスポーサブルチューブに分注し、乾燥させ、使用時にホットスタート用 Taq DNA ポリメラーゼを挿入し反応させることを特徴とする食中毒起因細菌の一括検出方法。 10

## 【請求項 3】

請求項 2 の組み合わせによるプライマー対群を 8 連 0.2 mL マイクロチューブに分注し、乾燥させたことを特徴とする食中毒起因細菌の一括検出試薬。

## 【請求項 4】

市販の塩化アンモニウムおよび塩化カリウムを含有する PCR バッファーを含むホットスタート用 PCR 試薬を請求項 3 に挿入したことを特徴とする食中毒起因細菌の一括検出試薬。

## 【発明の詳細な説明】 20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、食品衛生、食品工場、環境衛生、家畜衛生に係わる食中毒起因細菌を一括してスクリーニングする検査技術に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

食品衛生、食品工場、環境衛生、家畜衛生に係わる環境の中で、HACCP を中心とした微生物制御体制が計られている今日、対象となる細菌の種類は非常に多い。加えて、1999 年（平成 11 年）12 月、食品衛生法施行規則の一部を改正する省令（厚生省令第 105 号）により、我が国においては、従来から一般的な食中毒の原因物質とされてきた腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、ビブリオバルニフィカス、ウェルシュ菌、カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリ、リステリアモノサイトゲネス、エルシニアエンテロコリチカ、エルシニア・アシュードチュベクロシス、セレウス菌、黄色ブドウ球菌及びボツリヌス菌等に加えて、2 類感染症であるコレラ菌、赤痢菌及びチフス菌等が食品媒介性の原因物質として追加されている。これらの細菌の検査には一般的に培養検査が行われてきたが、検査方法が細菌種ごとに異なるため、事件毎に全ての検査を網羅することは不可能に近く、一括して検査ができる新検査技法の開発が望まれてきた。 30

## 【0003】

最近では、これらの細菌に対する簡便で迅速な同定方法の一つとして、細菌の保持している遺伝子を人工的に増幅することにより同定するポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」と略す。）が開発され、様々なプライマー対が設計され、市販されている。しかしながら、市販品の中では細菌の種類が制限されていることや、細菌を分離した後の性状試験を目的として商品化されているため高価であるといった問題点がある。このために、細菌が分離される前にスクリーニング的に応用することや一度の PCR で複数の遺伝子を同定するマルチプレックス PCR（以下「M-PCR」と略す。）へ応用することは非常に困難であった。これを解決する手段としては、自分でプライマー対をデザインし合成するか文献から選抜し合成する方法がある。しかし、前者ではまず基準菌株を用いてプライマー対の特異性を証明する必要がある、後者では膨大な数のプライマー対の中から適切なものを選抜しなければならない。 40 50

## 【0004】

現在まで、報告されてきたPCRを用いた研究は、細菌属レベルあるいは細菌種レベルでの応用である事が多い。複数種類の微生物を検査対象としたものには「微生物の検出方法、及び微生物の検出用プライマーセット」(特開2002-223766)がある。この発明は、広範に微生物種を同定する有効な方法であるが、食中毒起因細菌を対象にしておらず、M-PCRでの実施例がなく具体的な手段を提供していない。他に、13種類の食中毒起因細菌に対する一括検出方法の報告があるが(R-F. WANG et al, Journal of Applied Microbiology, 1997, 83, 727-736)、文献からのプライマー対の選抜方法について明記されておらず、実施例も少なく技術的に安定した成績がでることを証明していない。また、1種類の細菌に対し1種類のみの対象遺伝子をターゲットにしているため、判定がわかりにくい。 10

## 【0005】

M-PCRを実施する場合、対象とする細菌種数が多いことからプライマー対群の調整方法が煩雑になり、検査者毎の成績のバラツキやDNA汚染が生じやすくなる傾向にある。M-PCRに限らずPCR反応液の調製方法の不均一性は擬陽性や擬陰性の原因となっており、PCRを実施する上での適切な精度管理を困難にしている理由の一つとなっている。

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

このような状況の中で、本発明者等は、多数の既成PCR用プライマー対からの有効な選抜方法を確立すること、選抜プライマー対を用途に応じてグループ化し、それらの最適濃度条件を決定して調製方法を確立すること、ならびにプライマー対群調製済みのディスポーサブルチューブを作製することにより、食中毒起因細菌に対する迅速、簡便かつわかりやすい一括検出方法を確立するとともにPCRに対する最適な精度管理を提供することを目的とする。 20

## 【問題点を解決するための手段】

## 【0007】

上記課題を解決するための本発明は以下の技術的手段から構成される。

(1) 多種類のプライマー対の選抜方法について、グラジエント式サーマルサイクラー(i-Cycler, BIO-RAD)を用いて、プライマー対と標的DNAを挿入した反応液をアニーリング温度条件を変えて反応させ、至適アニーリング温度が55℃付近に存在するプライマー対を選び出すことで、M-PCRにおける最適および均一なアニーリング条件を提供することを特徴とする細菌の一括検出方法。 30

(2) 前(1)項でプライマー対群を検査用途にしたがってグループ化し、それぞれの競合作用を調べ、競合しないプライマー対群はそのままの条件を用い、競合するプライマー対群には濃度比を変えた反応液列を用いて最適濃度比を決定することで、グループ化後のプライマー対群の最適濃度条件を決定することを特徴とする細菌の一括検出方法。

(3) 第(1)項および前(2)項で選抜、調整したグループ化後プライマー対群溶液を、無菌およびDNAaseフリーのディスポーサブルチューブに分注し、乾燥させ、使用時にホットスタート用Taq DNAポリメラーゼを挿入し反応させることを特徴とする細菌の一括検出方法。 40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

本発明について更に詳細に説明する。

一般的に、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、チフス菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、コレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオバルニフィカス、ウェルシュ菌、カンピロバクタージェジュニ、カンピロバクターコリ、リステリアモノサイトゲネス、エルシニアエンテロコリテイカ、エルシニアシュードチュベクローシス、セレウス菌、黄色ブドウ球菌及びボツリヌス菌のような細菌を検出し同定するためには、選択分離培地による培養や有機物の分解性を観察する性状試験、染色法による形態観察および薬物感受 50

性試験等により細菌固有の性状を証明することが行われてきた。これらの検査方法は、細菌種ごとに異なっており、食中毒事件毎に全ての細菌種を網羅することは不可能に近く、事件の発生状況や検査者の判断で菌種の絞り込みを行い検査に供してきた。もちろん全ての事件に対して全ての検査を実施することは現実的ではなく必要性も乏しいが、一方で検査に供しても目的の細菌が検出されず、原因不明となることも少なくない。従って、多数の細菌種を一括して検査ができる新検査技法の開発が望まれてきた。

#### 【0009】

PCRが食品衛生検査に応用されるようになって久しいが、前述の食中毒起因細菌に対して、様々な研究者により様々なプライマー対が設計され、それぞれの特異性が証明されてきた。この中で細菌株間や数種類の細菌種間ではM-PCRが応用され、方法論も確立してきしたが、前述の細菌種を全般にわたって調査した報告は少ない。唯一、13種類の食中毒起因細菌に対する一括検出方法(R-F. WANG et al, Journal of Applied Microbiology, 1997, 83, 727-736)が報告されているが、実用性の面から未だ未完成である。

#### 【0010】

報告されてきた様々なプライマー対は、標的細菌種に対する特異性については十分に証明されており、この面では全く新規性はない。しかしながら、これらのデータは各研究者の至適条件下で評価されたものであり、相対的な評価は全くなされていない。また、本来PCRの良否を問うべきプライマーの設計はPCR法のコアをなすべき部分であるが、標的遺伝子を保持した細菌株や類属細菌の基準株の入手はもちろん、プライマーの設計と実験の繰り返しとが必要であるため、その証明は非常に困難であるとともに、標的細菌種数が多くなればなるほど莫大な時間、手間および費用を費やさなければならない。

#### 【0011】

既成のプライマー対は、かなりの数が報告されてきており、中には非常に有効なものが存在する。本発明のようにM-PCRを目的とする場合には有効なプライマー対を効率よく選抜し、組み合わせることで全く別の用途が生じる。例えば、鶏や豚の食肉工場では、サルモネラ属菌、リステリア属菌およびカンピロバクター属菌が重要な病原菌であるが、水産漁場ではビブリオ属菌、赤痢菌や大腸菌が主要な標的である。一方、乳製品工場では基本的に汚染の是非が最重要点であり、加えて大腸菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌およびカンピロバクターといった病原細菌のスクリーニングが必要である等、製品の種類によって重要管理点となる細菌の種類が異なっている。このように、製品の種類に応じて様々な細菌種の組み合わせが要求されるために、プライマー対の効率的な選抜方法を確立することは非常に有効なことである。

#### 【0012】

本発明者等は、既報の様々な文献や特許から抽出した多数のプライマー対の中から有効なプライマー対を簡便且つ効率的に抽出する方法を提案する。PCRのコアの試薬であるプライマー対は20～25対程度のオリゴヌクレオチドからなり、PCRの成否がこれにより左右されると言っても過言ではなく、その特性は塩基配列から計算されるGC含量とTm値による。ここで、Tm値は、簡便的にAとTとを2℃、GとCとを4℃として塩基配列から簡易的に算出できることが知られている。一般的にPCRで用いられるアニーリング温度はプライマー対のTm値から5℃程度下げた温度が用いられる。これらのことから、設計されたプライマーの塩基配列から至適アニーリング温度を便宜的に推測することは可能である。しかしながら、プライマー対と標的塩基配列との相性は周辺塩基配列の状況や繰り返し配列の存在あるいは反応液の組成等により千変万化であるため、実際には温度条件を変えて反応させることが簡便な最良の検証手段である。現在はグラジエント温度列によるPCRが可能なグラジエント式温度サイクラーを用いることにより至適アニーリング温度範囲を簡単に決定することができる。以上のことから、最初に各プライマー対の至適アニーリング温度範囲を決定することにより有効なプライマー対を選抜する。

#### 【0013】

図1により、文献や特許等から抽出した様々なプライマー対を調整した。即ち、これら

10

20

30

40

50

のプライマー対は、カラム精製グレードで合成されたものを用い（依頼合成、インビトロジェン）、合成された乾燥状態のオリゴヌクレオチドを滅菌蒸留水で $200\mu\text{M}$ に調製し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。単プライマー対の場合はセンス及びアンチセンスを終濃度 $10\mu\text{M}$ になるように調製し、マルチプレックスプライマー対の場合は最適濃度比となるように調製して使用溶液とし、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

【0014】

試験に供した細菌株の一覧表を表1に示した。一部の菌株を除き全て野生株を用いた。図1に示した処理方法により、これらの菌株からDNAを抽出した。即ち、 $0.5\text{mL}$ 用マイクロチューブに $200\mu\text{L}$ の滅菌蒸留水を分注し、予めTSA寒天培地に純培養した細菌集落の1/3白菌耳を懸濁した。 $100^{\circ}\text{C}$ 、10分間煮沸するかヒートブロックで加熱したのち、 $12,000\text{rpm}\times 3$ 分間遠心分離した上清 $2.5\mu\text{L}$ を粗DNA溶液として試験に供した。

表 1 供試菌株一覧

菌株番号	大腸菌(毒素)	菌株番号	サルモネラ属菌(O抗原)および赤痢菌	菌株番号	ビブリオ属菌(CT or TDH)
Eco1	<i>Escherichia coli</i>	SS1	<i>Salmonella</i> Typhi(09)	VIB1	<i>Vibrio cholerae</i> 0139(+)
Eco2	<i>E. coli</i>	SS2	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB2	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco3	<i>E. coli</i>	SS3	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB3	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco4	<i>E. coli</i>	SS4	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB4	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco5	<i>E. coli</i> IFO15034	SS5	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB5	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco6	<i>E. coli</i> IFO15036	SS6	<i>S. Typhi</i> (09)	VIB6	<i>V. cholerae</i> 01(+)
Eco7	<i>E. coli</i> IFO3972	SS7	<i>S. Haifa</i> (04)	VIB7	<i>V. cholerae</i> 0139(+)
Eco8	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)	SS8	<i>S. Typhimurium</i> (04)	VIB8	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco9	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)MIYAGI	SS9	<i>S. Tennessee</i> (07)	VIB9	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco10	<i>E. coli</i> -ETEC(LT)AKITA	SS10	<i>S. Thompson</i> (07)	VIB10	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco11	<i>E. coli</i> -ETEC(LTST)	SS11	<i>S. Mbandaka</i> (07)	VIB11	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco12	<i>E. coli</i> -ETEC(LTST)	SS12	<i>S. Newport</i> (08)	VIB12	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco13	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)	SS13	<i>S. Chincok</i> (08)	VIB13	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco14	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)MIYAGI	SS14	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB14	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco15	<i>E. coli</i> -ETEC(ST)AKITA	SS15	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB15	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco16	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS16	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB16	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco17	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS17	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB17	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco18	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS18	<i>S. Enteritidis</i> (09)	VIB18	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco19	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS19	<i>Shigella flexinellii</i>	VIB19	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco20	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS20	<i>S. flexinellii</i>	VIB20	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco21	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS21	<i>S. flexinellii</i>	VIB21	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco22	<i>E. coli</i> -O157(SLT1+2)	SS22	<i>S. flexinellii</i>	VIB22	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco23	<i>E. coli</i> -O157(SLT2)	SS23	<i>S. flexinellii</i>	VIB23	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco24	<i>E. coli</i> -O157(SLT2)	SS24	<i>Shigella sonnei</i>	VIB24	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco25	<i>E. coli</i> -O157(SLT2)	SS25	<i>S. sonnei</i>	VIB25	<i>V. parahaemolyticus</i> (+)
Eco26	<i>E. coli</i> -EIEC	SS26	<i>S. sonnei</i>	VIB26	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)
Eco27	<i>E. coli</i> -EIECMIYAGI	SS27	<i>S. sonnei</i>	VIB27	<i>V. vulnificus</i>
Eco28	<i>E. coli</i> -EIECAKITA	SS28	<i>S. sonnei</i>	VIB28	<i>V. vulnificus</i>
				VIB29	<i>V. vulnificus</i>
				VIB30	<i>V. vulnificus</i> MIYAGI
				VIB31	<i>V. vulnificus</i> MIYAGI
菌株番号	カンピロバクター属菌およびウェルシュ菌	菌株番号	黄色ブドウ球菌(毒素型)	菌株番号	リステリアモノサイトゲネス・エルシニア属菌・セラウス菌
CCW1	<i>Campylobacter lariids</i>	Sa1	<i>Staphylococcus aureus</i> (A型)	LYB1	<i>Listeria monocytogenes</i> MIYAGI
CCW2	<i>C. lariids</i>	Sa2	<i>S. aureus</i> (B型)	LYB2	<i>L. monocytogenes</i> AKITA
CCW3	<i>Campylobacter jejuni</i>	Sa3	<i>S. aureus</i> (-)	LYB3	<i>Yersinia enterocolitica</i> MIYAGI
CCW4	<i>C. jejuni</i>	Sa4	<i>S. aureus</i> (C型)	LYB4	<i>Y. enterocolitica</i> MIYAGI
CCW5	<i>C. jejuni</i>	Sa5	<i>S. aureus</i> (A型)	LYB5	<i>Y. enterocolitica</i> AKITA
CCW6	<i>C. jejuni</i>	Sa6	<i>S. aureus</i> (-)	LYB6	<i>Y. pseudotuberculosis</i> MIYAGI
CCW7	<i>C. jejuni</i>	Sa7	<i>S. aureus</i> (A型)	LYB7	<i>Bacillus cereus</i> MIYAGI
CCW8	<i>C. jejuni</i>	Sa8	<i>S. aureus</i> (-)	LYB8	<i>B. cereus</i> MIYAGI
CCW9	<i>C. jejuni</i>	Sa9	<i>S. aureus</i> (-)	菌株番号	ボツリヌス菌(毒素型)
CCW10	<i>Campylobacter coli</i>	Sa10	<i>S. aureus</i> (A型)	CB1	<i>Clostridium botulinum</i> (TypeA)
CCW11	<i>C. coli</i>	Sa11	<i>S. aureus</i> (AB型)MIYAGI	CB2	<i>C. botulinum</i> (TypeB)AKITA
CCW12	<i>Campylobacter fetus</i>	Sa12	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI	CB3	<i>C. botulinum</i> (TypeE)AKITA
CCW13	<i>C. fetus</i>	Sa13	<i>S. aureus</i> (D型)MIYAGI	CB4	<i>C. botulinum</i> (TypeA)AKITA
CCW14	<i>Clostridium perfringens</i> MIYAGI	Sa14	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI		
CCW15	<i>C. perfringens</i> MIYAGI	Sa15	<i>S. aureus</i> (A型)MIYAGI		
CCW16	<i>C. perfringens</i> MIYAGI	Sa16	<i>S. aureus</i> (C型)MIYAGI		
CCW17	<i>C. perfringens</i>	Sa17	<i>S. aureus</i> (A型)MIYAGI		
CCW18	<i>C. perfringens</i>	Sa18	<i>S. aureus</i> (-)MIYAGI		
CCW19	<i>C. perfringens</i>	Sa19	<i>S. aureus</i> (B型)MIYAGI		
CCW20	<i>C. perfringens</i>	Sa20	<i>S. aureus</i> (C型)MIYAGI		
CCW21	<i>C. perfringens</i>				
CCW22	<i>C. perfringens</i>				
CCW23	<i>C. perfringens</i>				

IFO番号の菌株は発酵研究所から分離された菌株、末尾MIYAGI及びAKITA株はそれぞれ宮城県保健環境センターおよび秋田衛生科学研究所から分離された菌株、その他は全て長崎県衛生公害研究所にて分離同定された菌株  
ETEC: 毒素原性大腸菌, EIEC: 侵入性大腸菌, EHEC: 出血性大腸菌

【0015】

各プライマー対の至適アニーリング温度範囲を測定した。PCR反応液は、至適pHを維持するためのPCR緩衝液、耐熱性ポリメラーゼ、プライマー対、4種のヌクレオチドおよび標的粗DNA溶液から構成される。最終的にM-PCRを目的とするため、本発明におけるポリメラーゼは、硫酸アンモニウムと塩化カリウムとをPCR緩衝液に使用する

ことで高度な特異性が期待できるホットスタートタックマスターミックスキット（キアゲン）を用いた。メーカー手順書に沿ってマスターミックスを調製し（終濃度塩化マグネシウム：1.5 mM, dNTP：200  $\mu$ M, その他の試薬組成未公表）、プライマー対濃度を最終0.4  $\mu$ Mに統一して挿入し、最後に標的DNA溶液2.5  $\mu$ Lを入れて最終反応液量25  $\mu$ Lで反応させた。PCR装置は、グラジエント式サーマルサイクラー（i-Cycler, BIO-RAD）を用いて、95℃×15minの前熱変性（ホットスタート用ポリメラーゼの活性化に必要）の後、95℃×30secの熱変性と45.0-70.0のグラジエントなアニーリング温度での反応（45sec）を35回繰り返し、72.0℃×7minの後伸長反応を行った。グラジエント温度の詳細は45.0、46.8、49.8、54.1、60.6、65.2、68.2、70.0℃である。 10

#### 【0016】

増幅産物は、終濃度0.5  $\mu$ g/mLとなるように臭化エチジウムを添加した2%アガロースゲル（アガロースL03, 宝酒造）を用いて、1×TAE溶液により100V、35min電気泳動した。この成績において、明確なバンドを形成する温度範囲を各プライマー対の至適アニーリング温度範囲とした（図2）。

#### 【0017】

測定したプライマー対は、用途とプライマー対数を考慮に入れて、大腸菌用、サルモネラ赤痢菌用、ビブリオ属菌用、キャンピロバクター・ウェルシュ菌用および黄色ブドウ球菌用にグループ化し、それぞれのマスターミックスの作製を試みた。各プライマー対は100  $\mu$ Mの保存溶液を適宜希釈混合して各々10  $\mu$ Mの試作混合液を調製し、最終濃度0.4  $\mu$ Mで試験に供した。 20



表 2 選抜、グループ化後のプライマー対一覧

Group Name	Product size	reference	target gene	Primer Name	Sequence	Length	%G	T <sub>m</sub>	T <sub>max</sub>	Final conc. (μM)
ECOMX	234	K ITO	SLT1&2	mMK2-1	GAGTTTACGATAGACCTTTGAC	23	43.5%	50.0	60.8	0.20
				mMK2-2	GGCCACATATAAATTATTTGCTC	24	33.3%	64.0		
	123	K ITO	LT	LT-11	OCCACCGATCACCA	15	60.7%	50.0	65.2	0.10
				LT-2	GTGCTCAGATTCTGGTCTC	20	65.0%	62.0		
	179	K ITO	ST	ST1a-s	GCAATTTTATTCTGTATTATCTTT	26	19.2%	62.0	54.1	0.20
				ST1a-as	GGATTACAACAAAGTTCACAG	21	38.1%	58.0		
				ST1b-s	TTTATTTTCTTTCTGTATTGTCTTT	26	19.2%	62.0		
				ST1b-as	GGATTACAACACAAATTCACAG	21	38.1%	58.0		
	379	K ITO	invE	I-1	ATATCTCTATTTCGAATGCGT	22	36.4%	60.0	60.8	0.10
				I-51	GGCGAGAAATTATATCCCG	19	47.4%	56.0		
SSMX	585	R-F WANG 1997	mazB promoter	Eco-1	GACCTCGGTTTAACTTCACAGA	21	47.6%	62.0	65.2	0.40
				Eco-2	CACACCGTGACCGTGACCA	19	63.2%	62.0		
	343	J SONG 1993	dH flagellin gene	ST3	AGATGGTAGTGGCGTTGCTC	20	55.0%	62.0	65.2	0.40
				ST4	TGGAGACTTGGTGGCGTAG	20	60.0%	64.0		
	275	RAHN 1992	invA	Sal-3	TATCGCCAGGTTTGGGCAA	19	57.6%	60.0	70.0	0.20
				Sal-4	TGCGACGCTCAAAGGAACC	19	57.6%	60.0		
	497	X.GUO 2000	hlyA	HILA2-F	CTGCGCGAGTGTTAAGGATA	20	50.0%	60.0	68.2	0.40
				HILA2-R	CTGTGCGCTTAATCGCATGT	20	50.0%	60.0		
	610	SETHABUTR 1993	hlyA	Sh-1	GTTGACCGGCTTTCCGGATAC	21	57.1%	68.0	65.2	0.40
				Sh-2	GAGCGACCGCTCTGAGAGTA	19	57.6%	60.0		
VIBMX	379	K ITO	invE	I-1	ATATCTCTATTTCGAATGCGT	22	36.4%	60.0	60.8	0.40
				I-51	GGCGAGAAATTATATCCCG	19	47.4%	56.0		
	215	E. VILLALBO	vtA	vtA-1	CTGCATTCTGGCAATCTGTCACATG	26	48.2%	78.0	70.0	0.20
				vtA-2	TGATGAGGTAAAGTTGGTAAAGGCGTGG	26	60.0%	78.0		
	380	K KOBAYASHI 1992	ctx	CT1	TCAAACATATATTGCTGGTC	20	35.0%	54.0	54.1	0.40
				CT2	CGCAAGTATTACICATCGA	19	42.1%	54.0		
	583	FIELDS 1992	ctx	VC-1	GGCAGATTCTAGACCTCGT	19	52.6%	58.0	65.2	0.20
				VC-2	TGGATGATCTTGGAGCATG	20	45.0%	58.0		
	251	NISHIBUCHI	TDH	TDH-1	GGTACTAAATGGCTGACATC	20	45.0%	58.0	60.8	0.10
				TDH-2	CCACTACACTCTCATATGC	20	50.0%	60.0		
CCIMX	399	Y B KIM 1999	ToxR	ToxR399-1	AGGCGGTTTGTTCAGAGTC	20	55.0%	62.0	68.2	0.40
				ToxR399-2	AACGAGTCTTCTGCATGGTG	20	50.0%	60.0		
	500	W B HILL 1991	cytotoxin-hemolysin gene	VVp1	CGGCGGTAGAGGTTGGCGG	20	75.0%	70.0	70.0	0.10
				VVp2	GGCCAGCAGTTTGGGGCC	19	73.7%	66.0		
	854	D LINTON 1997	16S rRNA	C-63-F	AATCTAATGGCTTAACCAITA	21	28.6%	54.0	60.6	0.40
				C-63-R	GTAAGTATGTTAGTATTCGGG	21	38.1%	58.0		
	735	"	hippuricase	CH-HP-F	GAAGAGGGTTTGGGTGGTG	19	57.6%	60.0	60.6	0.40
				CH-HP-R	AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG	23	39.1%	64.0		
	500	"	ORF of <i>C. coli</i> NCTC11368	CC18-F	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG	22	40.9%	62.0	60.8	0.10
				CC18-R	ATAAAGAGCTATCGTCGGCTG	21	42.9%	60.0		
CCIMX	283	P FACH 1997	<i>Campylobacter</i> phospholipase C	PL3	AAATTAGCTTTGGTGATAATCCG	24	41.7%	68.0	60.6	0.40
				PL7	ATAGATACTCCATATCATCTGCT	24	37.5%	66.0		
	428	"	<i>Campylobacter</i> enterotoxin	P145	GAAAGATCTGTATCTACAACTGGTGGTG	29	44.8%	84.0	65.2	0.40
				P148	GCTGGCTAAGATTCTATATTTTGTCCAG	30	38.7%	82.0		

【0018】

大腸菌用マスターミックス（以下「ECMX」。）は、malB遺伝子検出用プライマー対Eco-1&Eco-2（以下「pEco」。）、志賀毒素様毒素SLT遺伝子検出用プライマー対mMK2-1&mMK2-2（以下「pmMK」。）、毒素原性大腸菌易熱性毒素LT遺伝子検出用プライマー対LT-11&LT-2（以下「pLT」。）、毒素原性大腸菌耐熱性毒素ST遺伝子検出用プライマー対ST1a-s&ST1a-as&ST1b-s&ST1b-as（以下「pST」。）、およびinvE遺伝子検出用プライマー対I-1&I-51（以下「pI」。）が含まれる（表2）。 40

表3 選抜、グループ化後のプライマー対一覧

Group Name	Product size	reference	target gene	Primer Name	Sequence	Length	%C	T <sub>m</sub>	T <sub>max</sub>	Final conc. (μM)
LYBMX	680	A BURBET 1999	ip	LM-MONOA	CAAACTGTAAGACAGCTACT	21	42.5%	60.0	60.6	0.40
				LM-US1B	TTATACGGGAGGAGGCGAAG	21	52.4%	64.0		
	520	GOLSTEIN T 1991	enterohlysin O(hlyA)	LM-LL5	AAAGTATCCAGGCTGCTC	17	52.5%	62.0	60.6	0.40
				LM-LL4	GGGAGAGTTGAGATAT	17	47.1%	50.0		
	359	A RAMESH 2002	st	Ye-1	CTATTGGTTATCCGCAAAAG	20	46.0%	58.0	60.6	0.40
				Ye-2	TGCAAGTGGGTTGAATTGCA	20	46.0%	58.0		
	440	R-F WANG 1997	inv gene	YP-3	CTTGCGTGAATGGCAGAT	18	55.6%	66.0	65.2	0.40
				YP-4	TGCTGAGGTGACCGTGAT	18	55.6%	55.0		
	639	Y-R KM 2000	hemolysin BL	BO-HEL-F	GAAGGGTGGTATTTTGGGTGTAC	23	47.6%	68.0	60.6	0.40
				BO-HEL-R	AGGGTATGGGTTCAAGTTGTAAATG	23	43.5%	68.0		
SAMX	780	"	enterohlysin AB	BO-CEL-F	CATCGGCAAACTTTACGAACCT	23	47.6%	68.0	60.6	0.20
				BO-CEL-F	TAAATGCGCGCGCGAATAAAT	22	46.6%	64.0		
	185	R-F WANG 1997	hemolysin	BO-1	CTGTAGCGAAATCGTAGTATC	21	47.6%	62.0	54.1	0.10
				BO-2	TACTGCTCGACGACATTAAG	20	50.0%	60.0		
	102	M MEHROTRA 2000	enterotoxin A	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	20	55.0%	62.0	65.2	0.40
				GSEAR-2	GGGAGTTTGTGTGTGG	20	50.0%	60.0		
	184	"	enterotoxin B	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAACTGAGG	20	50.0%	60.0	60.6	0.40
				GSEBR-2	CGAAATAGTGACGAGTTAAG	20	45.0%	58.0		
	451	"	enterotoxin C	GSECR-1	AQATGAAAGTGTGTATGTGTATGG	24	37.5%	66.0	60.6	0.40
				GSECR-2	CACAGTTTGAATGCAACGG	20	40.0%	58.0		
CBMX	276	"	enterotoxin D	GSEDR-1	CGAATAATAAGAGAAATAAAG	23	26.1%	58.0	54.1	0.40
				GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTGGTTG	20	25.0%	60.0		
	209	"	enterotoxin E	GSEER-1	AGGTTTTTTCAGAGGTCATCG	21	42.9%	60.0	NT	0.40
				GSEER-2	GTTTTTTTTGTGGGTGAATG	21	33.3%	58.0		
	782	M LINDSTROM 2001	BonT A	CBML A1	AGCTACGGAGGCGAGGTATGTT	21	52.4%	64.0	60.6	0.40
				CBML A2	GGTATTGGGAAAGGTGAAAGG	22	40.9%	62.0		
	205	"	BonT B	CBML B1	CAGGAGAGGTGGAGCGGAAAA	20	50.0%	60.0	60.6	0.40
				CBML B2	GTGGGCGTTTGTTTTGTG	20	45.0%	58.0		
	389	"	BonT E	CBML E1	CGAAGATTTGTATGGCGGTA	20	45.0%	58.0	60.6	0.40
				CBML E2	GGTATTGATCGAAAGCGGTGA	21	42.9%	60.0		
	543	"	BonT F	CBML F1	GGGTTTATTAAGAGAGCGGA	20	50.0%	60.0	NT	0.40
				CBML F2	TAAATGCGGTAGCGCGGTAT	20	55.0%	62.0		
	283	K TAKESHI 1996	BonT A	AS-11	TGCAGGACAAATGCAACGAGT	21	47.6%	62.0	60.6	0.40
				AS-22	TGCAGCGGAAATCGGTATTGG	21	47.6%	62.0		
	315	"	BonT B	BS-11	CCTCGATTGCGGAGAGGTACG	21	57.1%	66.0	65.2	0.40
				BS-22	GTGTTGGAGTGGGAGAGGTGT	21	52.4%	64.0		
	290	"	BonT O	CS-11	ATACAGTAGCTAATGAGCGGTG	21	42.9%	60.0	NT	0.40
				CS-22	TGGAGTATTGTTATTGGGAGG	21	42.9%	60.0		
	497	"	BonT D	DS-11	GTGATCGGTGTTAATGCAATG	21	38.1%	58.0	NT	0.40
				DS-22	TGTTTGGAAATGAGGGAATGG	21	47.6%	62.0		
	258	"	BonT E	ES-11	CAGCGCGTTGTGCAAGATTTTA	22	40.9%	62.0	54.1	0.40
				ES-22	ATTAGTTTGTGAGAGTTTGTG	21	33.3%	58.0		
	332	"	BonT F	FS-11	CAATAGGAACGAATCGTAGTG	21	42.9%	60.0	NT	0.40
				FS-22	ATCAGGTGCTGCTGCGAATAAG	21	52.4%	64.0		

## 【0019】

サルモネラ赤痢菌用マスターミックス（以下「SSMX」。）は、dH flagellin遺伝子検出用プライマー対ST3&ST4（以下「pST」。）、invA遺伝子検出用プライマー対salm3&salm4（以下「psalm」。）、hlyA遺伝子検出用プライマー対HILA2-F&HILA2-R（以下「pHILA」。）、ipaH遺伝子検出用プライマー対Shi-1&Shi-2（以下「pShi」。）、およびinvE遺伝子検出用プライマー対I-1&I-51（以下「pI」。）、virA遺伝子検出用プライマー対virA-f&virA-r（以下「pvirA」。）が含まれる（表2）。 40

## 【0020】

ビブリオ属菌用マスターミックス（以下「VIBMX」。）は、ctx遺伝子検出用プライマー対CT1&CT2（以下「pCT」。）、ctx遺伝子検出用プライマー対VC-1&VC-2（以下「pVC」。）、耐熱性溶血毒素TDH遺伝子検出用プライマー対TDH-1&TDH-2（以下「pTDH」。）、ToxR遺伝子検出用プライマー対ToxR339-1&ToxR339-2（以下「pToxR」。）、およびcytotoxin-hemolysin遺伝子検出用プライマー対VVP1&VVP2（以下「pV 50

Vp」。)が含まれる(表2)。

#### 【0021】

キャンピロバクター・ウェルシュ菌用マスターミックス(以下「CCWMX」。)は、16SrRNA検出用プライマー対C-c&j-F&C-c&j-R(以下「pC-c&j」。)、hippuricase遺伝子検出用プライマー対CJ-HIP-F&CJ-HIP-R(以下「pHIP」。)、C. Coli (NCTC11366<sup>T</sup>株)オープンリーディングフレームORF検出用プライマー対CC18-F&CC18-R(以下「pCC」。)、phospholipaseC遺伝子検出用プライマー対PL3&PL7(以下「pPL」。)、およびenterotoxin遺伝子検出用プライマー対P145&P146(以下「pP」。)が含まれる(表2)。

10

#### 【0022】

リステリア・エルシニア・セレウス菌用マスターミックス(以下「LYBMX」。)は、iap遺伝子検出用プライマー対MONOA&LIS1B(以下「pLm1」。)、listeriolysin O遺伝子検出用プライマー対LL5&LL4(以下「pLm2」。)、ail遺伝子検出用プライマー対Ye1&Ye2(以下「pYe」。)、inv遺伝子検出用プライマー対YP-3&YP-4(以下「pYp」。)、hemolysinBL遺伝子検出用プライマー対HEL-F&HEL-R(以下「pHEL」。)、cereolysin AB遺伝子検出用プライマー対CEL-F&CEL-R(以下「pCEL」。)、およびhemolysin遺伝子検出用プライマー対BC-1&BC-2(以下「pBc」。)が含まれる(表3)。

20

#### 【0023】

黄色ブドウ球菌用マスターミックス(以下「SAMX」。)は、enterotoxinA遺伝子検出用プライマー対GSEAR-1&GSEAR-2(以下「pGSEAR」。)、enterotoxinB遺伝子検出用プライマー対GSEBR-1&GSEBR-2(以下「pGSEBR」。)、enterotoxinC遺伝子検出用プライマー対GSECR-1&GSECR-2(以下「pGSECR」。)、enterotoxinD遺伝子検出用プライマー対GSEDR-1&GSEDRF-2(以下「pGSEDR」。)、及びenterotoxinE遺伝子検出用プライマー対GSEER-1&GSEER-2(以下「pGSEER」。)が含まれる(表3)。

30

#### 【0024】

ポツリヌス菌用マスターミックス(以下「CBMX」。)は、BonTA遺伝子検出用プライマー対CBMLA1&CBMLA2(以下「pCBMLA」。)、BonTB遺伝子検出用プライマー対CBMLB1&CBMLB2(以下「pCBMLB」。)、BonTE遺伝子検出用プライマー対CBMLE1&CBMLE2(以下「pCBMLE」。)、BonTF遺伝子検出用プライマー対CBMLF1&CBMLF2(以下「pCBMLF」。)、BonTA遺伝子検出用プライマー対AS11&AS-22(以下「pAS」。)、BonTB遺伝子検出用プライマー対BS-11&BS-22(以下「pBS」。)、BonTC遺伝子検出用プライマー対CS-11&CS-22(以下「pCS」。)、BonTD遺伝子検出用プライマー対DS-11&DS-22(以下「pDS」。)、BonTE遺伝子検出用プライマー対ES-11&ES-22(以下「pES」。)、およびBonTF遺伝子検出用プライマー対FS-11&FS-22(以下「pFS」。)が含まれる(表3)。

40

#### 【0025】

以上のマスターミックス群を用いて、表1の菌株について、PCRを実施した。この成績により、プライマー対同士の競合作用が認められる場合は、増幅されるべきバンドが消失したり、薄く反応して増幅効率に影響が認められ、そうでない場合は明瞭なバンドが形成される。ここで、図3に示したフローに沿って最適濃度比を決定するために競合PCRを次により実施した。競合しないプライマー対群はそのままの条件を用い、競合するプライマー対群には影響される側のプライマー濃度を1とし、影響する側のプライマー対を2倍段階希釈したプライマー溶液を6列作製して、コンペティティブに反応させる。その成

50

績により、両者プライマー対の最適濃度比を決定し、最終的にミックスプライマーの濃度比を決定した。

#### 【0026】

ECMXにおいて p E c o は他の4種全てと競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プライマー対の濃度比は p m M K : p L T : p S T : p I : p E c o = 2 : 1 : 2 : 1 : 4 (プライマー対最終濃度は各々 0.2  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M) であった(表2)。

#### 【0027】

SSMXでは、p S A L と p H I L A がそれぞれ競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プライマー対の濃度比は p S T : p S A L : p H I L A : p S h i : p I : p v i r A = 2 : 1 : 2 : 2 : 2 : 1 (プライマー対最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M) であった(表2)。

#### 【0028】

VIBMXでは、p T o x R と p T D H および p V V p が競合作用を示した。成績(図4)により決定した各プライマー対の濃度比は p C T : p V C : p T o x R : p T D H : p V V p = 4 : 2 : 4 : 1 : 1 (プライマー対最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M) であった(表2)。

#### 【0029】

CCWMXでは、p C - c & j と p H I P および p C C が、それぞれ競合作用を示した(図4)。成績により決定した各プライマー対の濃度比は、p P L : p P : p C - c & j : p H I P : p C C = 4 : 4 : 4 : 4 : 1 (プライマー対最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M) であった(表2)。

#### 【0030】

LYBMXでは、p H E L と p C E L および p B C に競合作用が認められた。成績(図4)により決定した各プライマー対の最終濃度比は、p L m 1 : p L m 2 : p Y e : p Y p : p H E L : p C E L : p B c = 4 : 4 : 4 : 4 : 4 : 2 : 1 (プライマー対最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M : 0.1  $\mu$ M) であった(表3)。

#### 【0030】

SAMXは、既製のM-PCR用プライマーであり、文献から引用した濃度比により目的のバンドが良好に増幅された。決定した各プライマー対の濃度比は、p G S E A R : p G S E B R : p G S E C R : p G S E D R : p G S E E R = 1 : 1 : 1 : 1 : 1 (プライマー対最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M) であった(表3)。

#### 【0031】

CBMXは、既製のM-PCR用プライマーであり、p C B M L A を除き、文献から引用した濃度比により目的のバンドが良好に増幅された。p C B M L A では 782 b p のバンドが増幅されるはずであったが p C B M L B と同じ 205 b p 程度のバンドが検出された。したがって、同様にボツリヌス神経毒を対象としている別のM-PCRでデザインされたプライマーと組み合わせて使用することにした。決定した各プライマー対の最終濃度比は、p C B M L A : p C B M L B : p C B M L E : p C B M L F : p A S : p B S : p C S : p D S : p E S : p F S = 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 (プライマー最終濃度は各々 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M : 0.4  $\mu$ M) であった(表2)。

#### 【0032】

以上の方法で調製したプライマー対溶液を、無菌およびDNAaseフリーのディスプレイサブルチューブに分注し、乾燥させることを試みた。合成プライマーは全て保存溶液が 200  $\mu$ M となるように調製した。これらの保存溶液を用いて、各種マスターミックスを、前述の濃度比で 0.5 mL マイクロチューブに 100  $\mu$ L 調製した。即ち、ECMXは p m M K 原液、p L T 原液、p S T 原液、p I 原液、および p E c o 原液の各々 2.5  $\mu$  50

L、0.625  $\mu$ L、2.5  $\mu$ L、0.625  $\mu$ Lおよび5  $\mu$ Lずつを0.5 mLマイクロチューブに入れ滅菌蒸留水で100  $\mu$ Lとした。同様にSSMX、VIBMX、CCWMX、およびSAMXを調製した。これらのマスターミックスを滅菌済み8連チューブ用分割リザーバー（B-0817-1、ビーエム機器）にその順番で注入し、第8番目の分割容器にはDWを100  $\mu$ L注入した。これらをよく混釈した後、8連マイクロピペットを用いて、各々の分割容器から1  $\mu$ Lをキャップ付き8連チューブに分注し、濃縮乾燥機（マイクロ遠心エバポレーター、旭テクノグラス）を用いて、60℃で3時間程度処理して完全に乾燥させた。これを食中毒起因細菌一括検出試薬とした。

#### 【実施例1】

##### 【0033】

食中毒起因細菌一括検出試薬を使用して特異性を確認した。耐熱性ポリメラーゼは、高度な特異性が期待でき、簡便な操作で準備できるホットスタートマスターミックスキット（キアゲン）を用いた。メーカー手順書に沿ってマスターミックスを調製し（終濃度塩化マグネシウム：1.5 mM、dNTP：200  $\mu$ M、その他の試薬組成未公表）、無菌的に、食中毒起因細菌一括検出試薬にチューブ当たり22.5  $\mu$ Lずつ分注した。最後に表1で準備した標的DNA溶液2.5  $\mu$ Lを株番号の順番で各々のマスターミックスに対応するように入れて反応させた。サーマルサイクラーの温度条件は、95℃×15 minの前熱変性（ホットスタート用ポリメラーゼの活性化に必要）の後、95℃×30 secの熱変性、55.0℃×30 secのアニーリング、72℃×30 secの伸長反応を35回繰り返し、72.0℃×7 minの後伸長反応を行った。増幅産物は、マスターミックス毎に株番号の順番で泳動した。電気泳動は終濃度0.5  $\mu$ g/mLとなるように臭化エチジウムを添加した2%アガロースゲル（アガロースL03、宝酒造株式会社）を用いて、1×TAE溶液により100 V、25 min行った。

##### 【0034】

成績を図5～10に示した。

ECOMXにより非病原性大腸菌（株番号EC1-7）、腸管毒素原性大腸菌（株番号EC3&4）、腸管侵入性大腸菌（株番号EC5&6）および腸管出血性大腸菌（株番号EC7&8）を明確に分別することが可能となった。SSMXによりチフス菌（株番号SS1&2）、赤痢菌（株番号SS3, 4, 5&6）、サルモネラ属菌（株番号SS7&8）を明確に分別することが可能となった。VIBMXによりコレラ菌（株番号VIB1&2）、耐熱性毒素産生性腸炎ビブリオ（株番号VIB3&4）、耐熱性毒素非産生性腸炎ビブリオ（株番号VIB5&6）およびビブリオバルニフィカス（株番号VIB7&8）を明確に分別することが可能となった。CCWMXにより毒素産生性ウェルシュ菌（株番号CCW1&2）、毒素非産生性ウェルシュ菌（株番号CCW3&4）、キャンピロバクター・ジェジュニ（株番号CCW5&6）およびキャンピロバクター・コリ（株番号CCW7&8）を明確に分別することが可能となった。LYBMXによりリステリアモノサイトゲネス（株番号LYB1&2）、エルシニアエンテロコリティカ（株番号LYB3, 4&5）、エルシニアシュードチュベクロシス（株番号LYB6）およびセレウス菌（株番号LYB7&8）を明確に分別することが可能となった。SAMXによりエンテロトキシンA陽性株（株番号SA1）、エンテロトキシンA&B陽性株（株番号SA2）、エンテロトキシンB陽性株（株番号SA3&7）、エンテロトキシンC陽性株（株番号SA5, 6&8）およびエンテロトキシンD陽性株（株番号SA4）を明確に分別することが可能となった。CBMXによりニューロトキシンA陽性株（株番号CB1&4）、ニューロトキシンB陽性株（株番号CB2）およびエンテロトキシンE陽性株（株番号CB3）を明確に分別することが可能となった。

##### 【0035】

以上の試験は模擬的に実施したものであるが、実際は1セットの食中毒起因細菌検出試薬により1検体をスクリーニングするのに用いられるため、以上の株の内どれかのバンド形態をもって検出されることになる。このことにより、1セットの食中毒起因細菌検出試薬を用いた18細菌種の一括検出が可能となる。

## 【発明の効果】

【0036】

本発明により次の効果が得られた。

▲1▼以上のように、請求項1記載の発明によれば、複数種類の病原細菌を対象として、プライマー対設計並びに特異性証明に必要な時間、労力および経費を節減することができる。

▲2▼請求項2，請求項3および請求項4記載の発明によれば、精度管理に有効なマルチプレックスPCR法を利用した簡便、迅速かつ安価な一括検出方法および試薬を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

10

【図1】PCR検査フローを示す図である。

【図2】選抜プライマーグラジエント成績一覧を示す写真である。

【図3】競合PCR検査フローを示す図である。

【図4】プライマー対同士の競合作用を示す写真である。

【図5】ECOMXによる大腸菌株の一括検出成績を示す写真である。

【図6】SSMXによるサルモネラ属菌株と赤痢菌株の一括検出成績を示す写真である。

【図7】VIBMXによるビブリオ属菌株の一括検出成績を示す写真である。

【図8】CCWMXによるカンピロバクター属菌株およびウェルシュ菌株の一括検出成績を示す写真である。

【図9】SAMXによる黄色ブドウ球菌菌株の一括検出成績を示す写真である。

20

【図10】LYBMXによるリステリアモノサイトゲネス、エルシニアエンテロコリテカ、エルシニアシュードチューベクロシスおよびセレウス菌の一括検出成績とCBMXによるボツリヌス菌株の一括検出成績を示す写真である。

【図1】

## 図面代用写真(カラー)

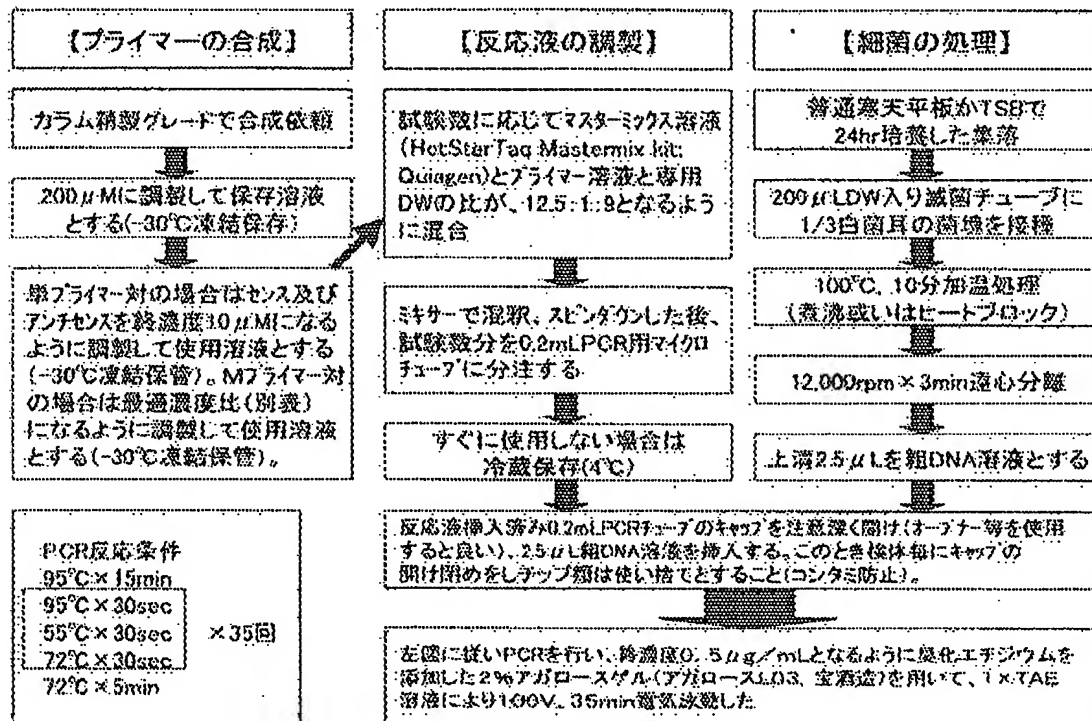


図1 PCR検査フロー

【図 2】

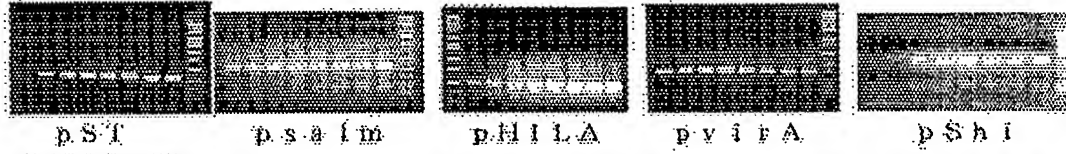
選別プライマーグラジエント成績一覧

図面代用写真

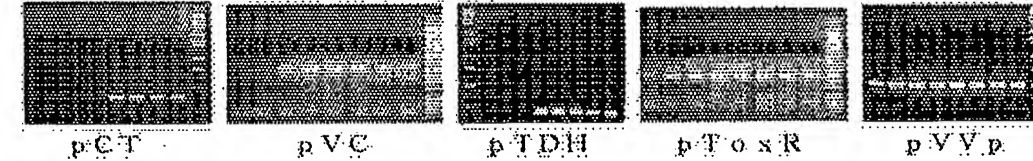
## A) ECOMX



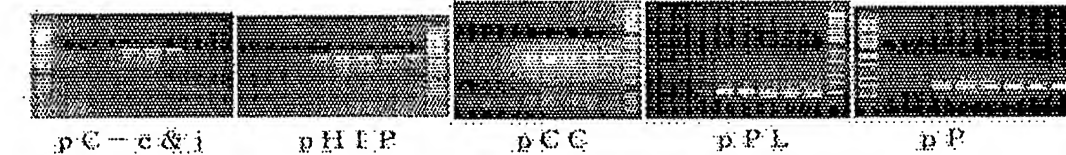
## B) SSMX



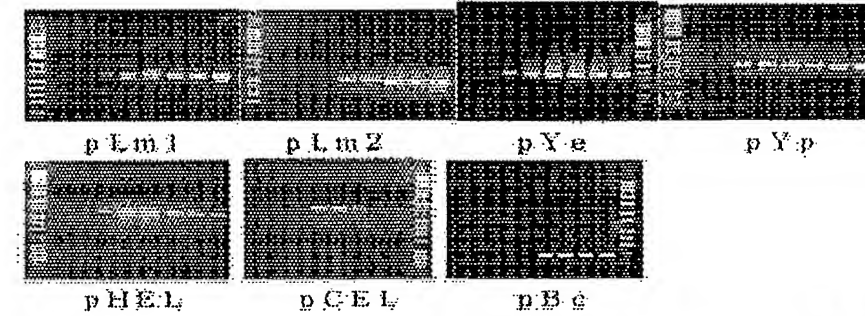
## C) VIBMX



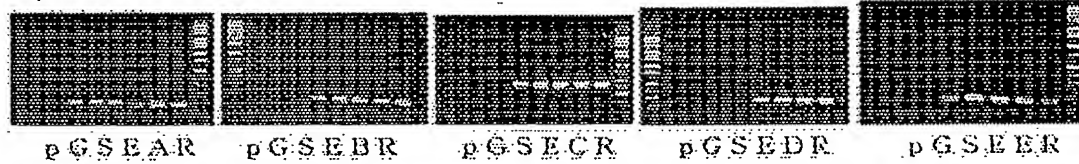
## D) CCWMX



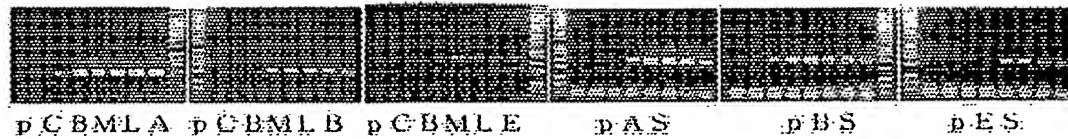
## E) LYBMX



## F) SAMX



## G) CBMX





【図 3】

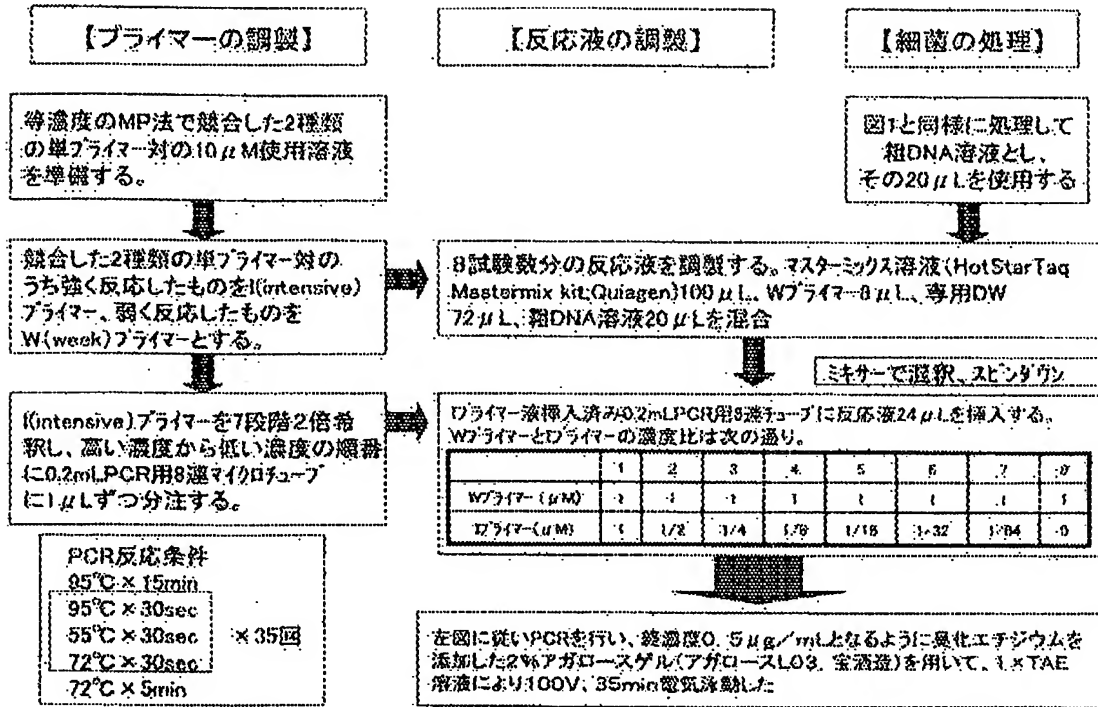
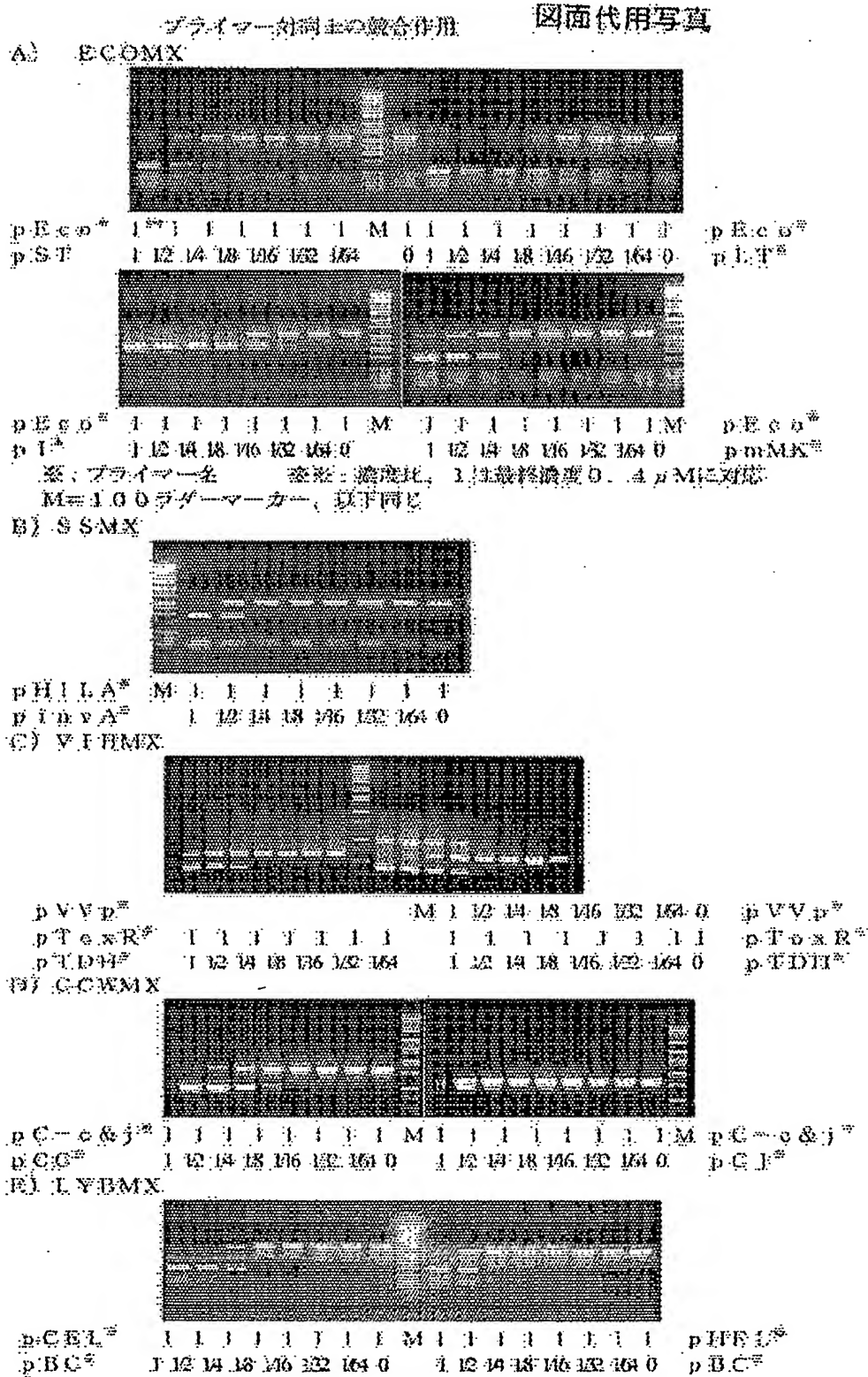


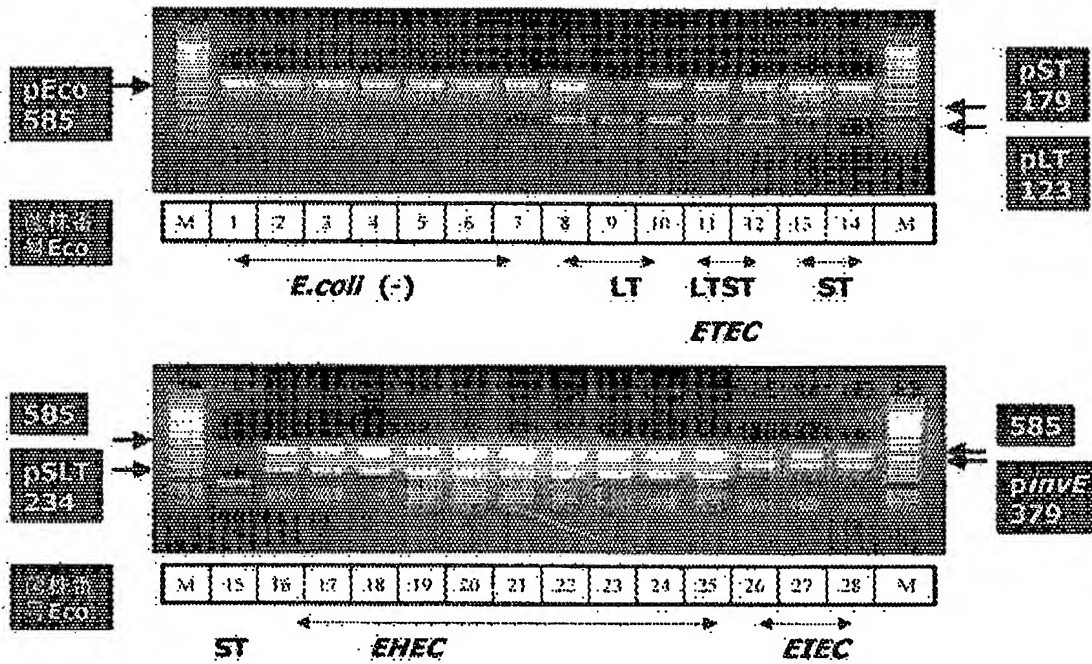
図3 競合PCRフロー

【図4】



【図5】

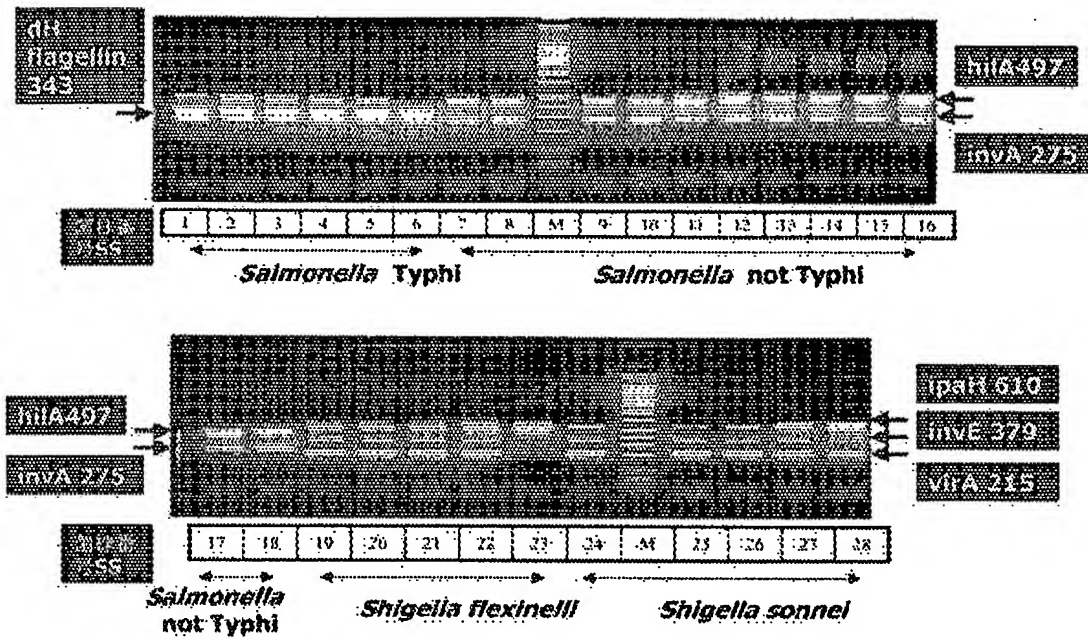
図面代用写真(カラー)



【図5 ECOMX一括検出成績】

【図 6】

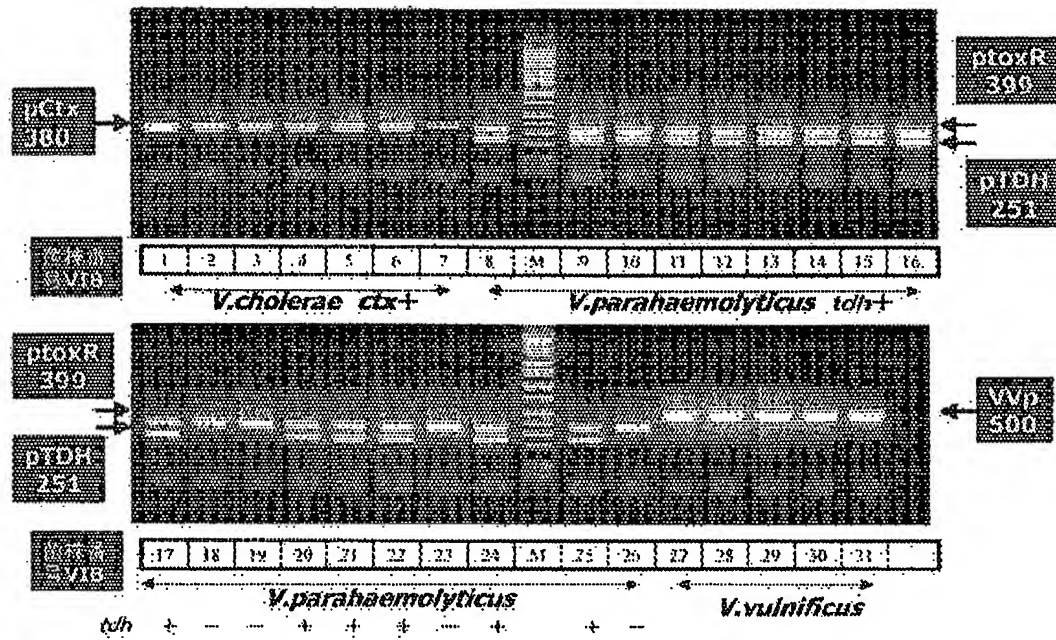
図面代用写真(カラー)



【図6 SSMX一括検出成績】

【図 7】

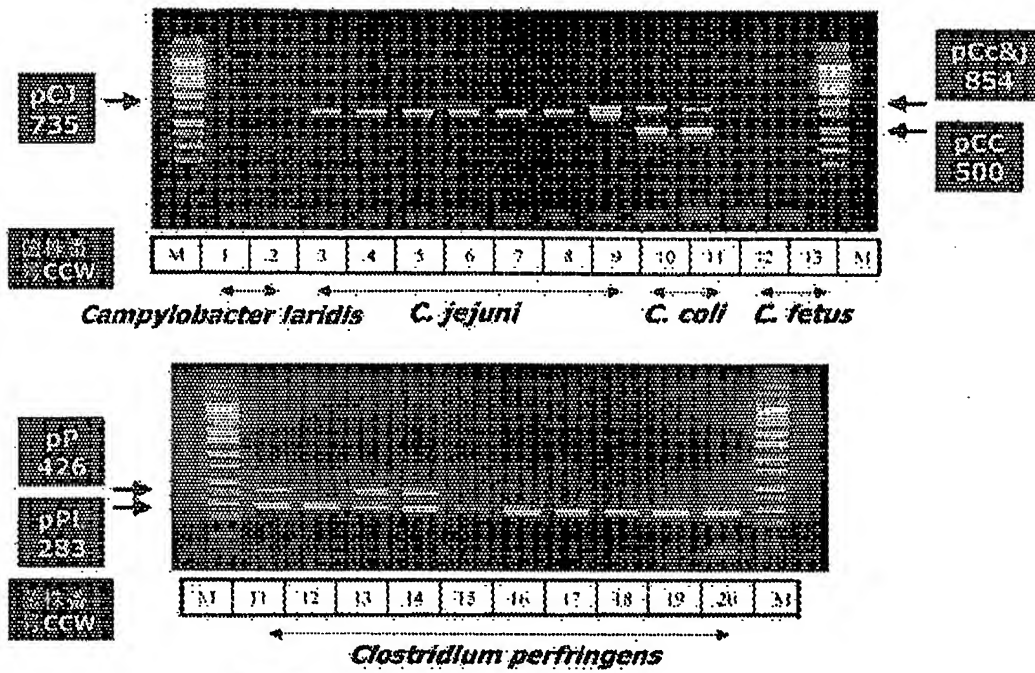
図面代用写真(カラー)



【図7 VIBMX一括検出成績】

【図 8】

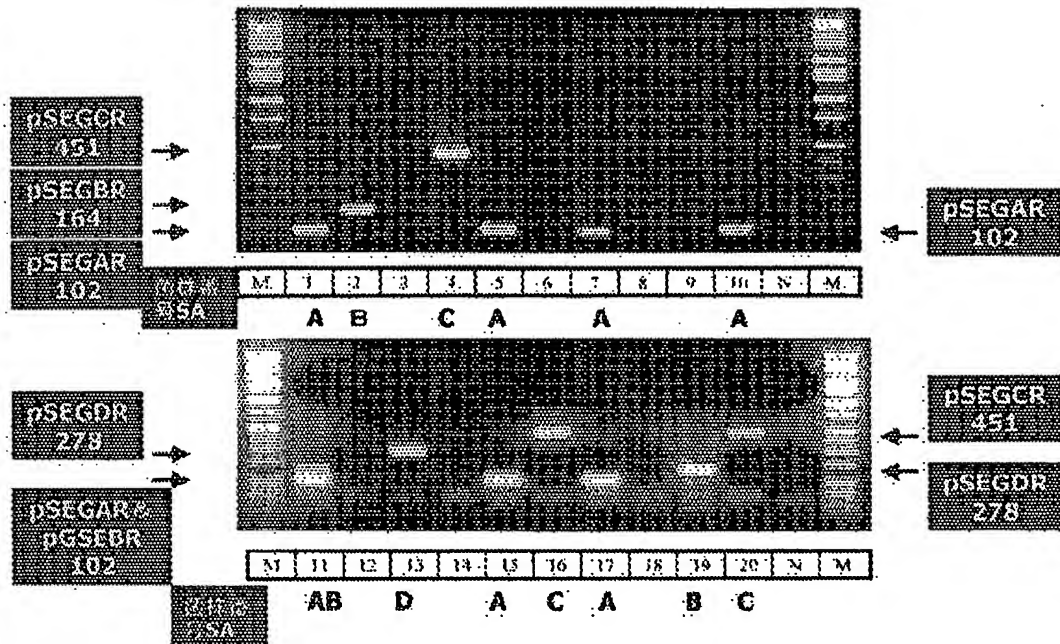
図面代用写真(カラー)



【図8 CCWMX一括検出成績】

【図9】

図面代用写真(カラー)

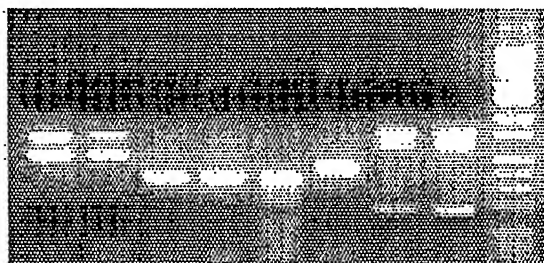


【図9 SAMX一括検出成績】

【図10】

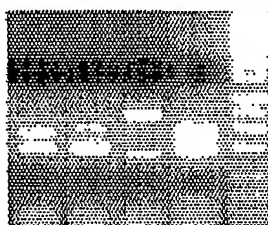
図面代用写真(カラー)

1) LYBMXによる一括検出成績



LYBI 2 3 4 5 6 7 8 M

2) CBMXによる一括検出成績



CBI 2 3 4 M



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

// C 1 2 N 15/09

F I

C 1 2 N 15/00

A

デーマコード (参考)